

Rita Maria da Silva^I

Márcia Dalastra Laurenti^{II}

Almério de Castro Gomes^{III}

Yeda Lopes Nogueira^{IV}

Análise TG-ROC de testes de imunofluorescência no diagnóstico de leishmaniose visceral canina

TG-ROC analysis of immunofluorescence assays in canine visceral leishmaniasis diagnosis

RESUMO

OBJETIVO: Analisar a acurácia do diagnóstico de dois protocolos de imunofluorescência indireta para leishmaniose visceral canina.

MÉTODOS: Cães provenientes de inquérito soroepidemiológico realizado em área endêmica nos municípios de Araçatuba e de Andradina, na região noroeste do estado de São Paulo, em 2003, e área não endêmica da região metropolitana de São Paulo, foram utilizados para avaliar comparativamente dois protocolos da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para leishmaniose: um utilizando antígeno heterólogo *Leishmania major* (RIFI-BM) e outro utilizando antígeno homólogo *Leishmania chagasi* (RIFI-CH). Para estimar acurácia utilizou-se a análise *two-graph receiver operating characteristic* (TG-ROC). A análise TG-ROC comparou as leituras da diluição 1:20 do antígeno homólogo (RIFI-CH), consideradas como teste referência, com as diluições da RIFI-BM (antígeno heterólogo).

RESULTADOS: A diluição 1:20 do teste RIFI-CH apresentou o melhor coeficiente de contingência (0,755) e a maior força de associação entre as duas variáveis estudadas (qui-quadrado=124,3), sendo considerada a diluição-referência do teste nas comparações com as diferentes diluições do teste RIFI-BM. Os melhores resultados do RIFI-BM foram obtidos na diluição 1:40, com melhor coeficiente de contingência (0,680) e maior força de associação (qui-quadrado=80,8). Com a mudança do ponto de corte sugerido nesta análise para a diluição 1:40 da RIFI-BM, o valor do parâmetro especificidade aumentou de 57,5% para 97,7%, embora a diluição 1:80 tivesse apresentado a melhor estimativa para sensibilidade (80,2%) com o novo ponto de corte.

CONCLUSÕES: A análise TG-ROC pode fornecer importantes informações sobre os testes de diagnósticos, além de apresentar sugestões sobre pontos de cortes que podem melhorar as estimativas de sensibilidade e especificidade do teste, e avaliá-los a luz do melhor custo-benefício.

DESCRIPTORIOS: Leishmaniose Visceral, diagnóstico. Cães. Imunofluorescência. Técnicas de Diagnóstico e Procedimentos. Sensibilidade e Especificidade. Estudos Soroepidemiológicos.

^I Seção de Parasitologia. Divisão de Laboratórios Regionais. Instituto Adolfo Lutz. Rio Claro, SP, Brasil

^{II} Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina. Universidade São Paulo (USP). São Paulo, SP, Brasil

^{III} Departamento de Epidemiologia. Faculdade de Saúde Pública. USP. São Paulo, SP, Brasil

^{IV} Seção de Sorologia. Divisão de Biologia Médica. Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, SP, Brasil

Correspondência | Correspondence:

Rita Maria da Silva
Instituto Adolfo Lutz – Rio Claro
Rua Dez, 152 – Consolação
13500-090 Rio Claro, SP, Brasil
E-mail: ritsilva@terra.com.br

Recebido: 22/4/2008

Revisado: 1/10/2008

Aprovado: 4/2/2009

ABSTRACT

OBJECTIVE: To analyze the accuracy of the diagnosis of two protocols of indirect immunofluorescence assays for canine visceral leishmaniasis.

METHODS: Dogs from the seroepidemiological survey conducted in an endemic area of the cities of Araçatuba and Andradina, in Northwestern São Paulo state, in 2003, and in a non-endemic area of the metropolitan region of São Paulo, were used to assess two protocols of indirect immunofluorescence assay (IFA) for leishmaniasis: one using a *Leishmania major* heterologous antigen (IFA-BM) and another using a *Leishmania chagasi* homologous antigen (IFA-CH). Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis was used to estimate accuracy. TG-ROC analysis compared 1:20 dilution readings of the homologous antigen (IFA-CH), considered as reference test, with IFA-BM dilutions (heterologous antigen).

RESULTS: The 1:20 dilution used in the IFA-CH test showed the best contingency coefficient (0.755) and the highest strength of association between the two variables studied (chi-square=124.3). Thus, it was considered the test reference dilution in comparisons with different IFA-BM test dilutions. The best IFA-BM results were obtained from 1:40 dilutions with the best contingency coefficient (0.680) and highest strength of association (chi-square=80.8). With the change in the cut-off point, recommended for the IFA-BM 1:40 dilution in this analysis, the specificity parameter value rose from 57.5% to 97.7%, even though the 1:80 dilution showed the best sensitivity estimate (80.2%), with the new cut-off point.

CONCLUSIONS: TG-ROC analysis can provide important information about diagnostic tests, in addition to offering suggestions on cut-off points that can improve test sensitivity and specificity estimates and assessing these tests in terms of the best cost-benefit ratio.

DESCRIPTORS: Leishmaniasis, Visceral, diagnosis. Dogs. Fluorescent Antibody Technique. Diagnostic Techniques and Procedures. Sensitivity and Specificity. Seroepidemiologic Studies.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral americana (LVA) atinge 88 países, dos quais 90% dos casos ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil.^a

No Brasil, a LVA é considerada endêmica em 19 estados, principalmente na região Nordeste, onde ocorre notificação de maior número de casos e tem apresentado mudanças no padrão de transmissão.

Inicialmente, considerada doença predominante em ambientes rurais e periurbanos, hoje tem sido registrada em grandes centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Corumbá (MS).^{10,b,c}

No estado de São Paulo, o primeiro relato de autoctonia da doença humana foi registrado na região metropolitana de São Paulo, em 1978.¹⁰ Todavia, na época, não foi possível identificar reservatório e vetor nos elos da cadeia de transmissão. Em 1998, no município de Araçatuba, foi detectada a presença de *Leishmania sp.* em exame parasitológico direto de cães com suspeita clínica de leishmaniose visceral canina (LVC), sendo posteriormente identificada como *Leishmania chagasi*. Estes fatos, aliados à presença do inseto transmissor, *Lutzomyia longipalpis*, notificada em 1997, confirmaram a autoctonia de LVC em cães na área urbana de

^a World Health Organization. Tropical disease research: progress 2003-2004. Seventeenth Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases. TDR 2005. Geneva; 2005. (Programme Report, 17). Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/publications/pr17.htm>

^b Camargo-Neves VLF, Glasser CM, Cruz LL, Almeida RG. Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. São Paulo: Ministério da Saúde. Secretaria de Estado da Saúde; 2006.

^c Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral; 2006.

Araçatuba. Em 1999, no mesmo município, foi relatado o primeiro caso humano autóctone neste município.^a

Em geral, os programas oficiais de vigilância e controle de LVC preconizam a realização de inquéritos sorológicos caninos visando conhecer a situação epidemiológica da doença nas áreas com transmissão ativa ou com potencial de transmissão e simultaneamente à identificação dos cães sorologicamente positivos para posterior eliminação.^{a,b} Estudos enfatizam a importância dos parâmetros de sensibilidade e especificidade dos testes quando avaliam o impacto da eliminação do cão frente à metodologia sorológica empregada.³ Pesquisas que avaliaram os resultados obtidos nos inquéritos epidemiológicos realizados em Belo Horizonte^{1,2} utilizando kit feito com o antígeno de *Leishmania major*, sugerem que a utilização da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) poderia comprometer a efetividade do Programa de Controle da LVC por não estar detectando animais infectados, em virtude dos resultados falsos negativos, e ao mesmo tempo, identificando cães não infectados (falsos positivos) com consequente recomendação de sua eliminação, de acordo com o Programa de Controle da doença.

O presente estudo teve por objetivo analisar a acurácia de dois protocolos da reação de imunofluorescência indireta para leishmaniose visceral canina.

MÉTODOS

Os testes foram realizados em dois grupos de amostras.

O grupo A foi constituído por 94 amostras de soros de cães machos e fêmeas de idades e raças diversas, das quais 74 eram provenientes de inquérito soropidemiológico realizado nos municípios de Araçatuba e de Andradina, área endêmica da região noroeste do estado de São Paulo.

Foram acrescentadas 20 amostras de soros de cães negativos provenientes do município de São Paulo, uma área considerada sem transmissão, na época da coleta (2003).

Todos os cães foram avaliados quanto ao estado clínico, além de terem sido avaliados sorologicamente para o diagnóstico de LVC pela RIFI e por exame parasitológico direto. Desta forma, os cães do grupo A foram considerados como população referência, dos quais 50 apresentaram diagnósticos positivos classificados clinicamente como: sintomáticos (30 cães), oligossintomáticos (18 cães) e assintomáticos (dois cães). Havia 24 animais com diagnóstico negativo pertencentes à

área endêmica e 20 provenientes de área considerada não endêmica.

O grupo B foi constituído por 160 amostras pareadas de soro e sangue, colhidas em papel filtro, de cães provenientes dos mesmos municípios e que participaram de inquéritos sorológicos para LVA.

Foram comparados dois testes de RIFI: um utilizando formas promastigotas de *Leishmania major* (antígeno heterólogo), (RIFI-BM, Biomanguinhos, Fiocruz), e o outro formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (antígeno homólogo), (RIFI-CH, Laboratório de Patologia de Doenças Infecciosas, Faculdade de Medicina da USP). Em ambos os testes, as amostras foram avaliadas semi-quantitativamente, nas diluições 1:20, 1:40, 1:80 e 1:160. Os testes foram realizados em duplicata e as amostras foram re-numeradas, de modo que as leituras fossem feitas como um teste cego.

As leituras da RIFI foram realizadas em microscópio de fluorescência com aumento de 400 vezes, sendo o critério de leitura adotado de acordo com a densidade de parasitos fluorescentes e definido em número de cruzes: 1+, 2+, 3+ e 4+, formando um escore. Este escore foi transformado em percentagens, para que a variável quantitativa se transformasse em contínua, possibilitando utilizar a técnica *Two-Graph Receiving Operator Characteristics* (TG-ROC).⁷ A leitura realizada com a RIFI-CH serviu de parâmetro de comparação: como regra geral, o campo visual do microscópio foi dividido em quatro quadrantes, cada quadrante preenchido com parasitos fluorescentes equivalendo a 25% de fluorescência ou 1+.^c

Para cada conjunto de resultados obtidos nas leituras dos testes RIFI-BM e RIFI-CH foram feitas análises sobre a distribuição de frequências para cada diluição dos soros *versus* as formas clínicas, calculado o qui-quadrado e os coeficientes de contingências extraídos das tabelas de contingências. Para esta análise utilizou-se o pacote estatístico Medcalc.^d

As estimativas dos pontos de cortes, bem como os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e eficiência foram obtidos por meio da análise gráfica gerada pela técnica TG-ROC⁷ do pacote estatístico CMDT.⁸

RESULTADOS

Observa-se leituras da RIFI-CH e RIFI-BM^e que com o antígeno homólogo da RIFI-CH, a reação de

^a Camargo-Neves VLF, Glasser CM, Cruz LL, Almeida RG. Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. São Paulo: Ministério da Saúde. Secretaria de Estado da Saúde; 2006.

^b Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral; 2006.

^c A leitura realizada em microscópio de fluorescência (aumento 400 vezes) pode ser consultada na versão online da Revista de Saúde Pública em www.scielo.br/rsp

^d Schoonjans F. MedCalc statistic for biomedical research: software manual. Mariakerke: Medcalc Statistical Software; 1998.

imunofluorescência é mais específica que a RIFI com antígeno heterólogo (RIFI-BM), a qual apresenta uma reação de fundo inespecífica, que muitas vezes prejudica a leitura correta.

Os resultados expressos nas Tabelas 1 e 2, referentes às amostras do grupo A mostram as distribuições, nos dois testes (RIFI-CH e RIFI-BM) das leituras nas diferentes categorias, da variável diagnóstico clínico *versus* a variável diluição dos soros.

Do total de amostras analisadas de 94 soros do grupo A, quando comparados os resultados dos dois testes observou-se que no grupo dos verdadeiros negativos (cl clinicamente classificados como sadios) 95,4% (42/44) foram não-reagentes pela RIFI-CH, nas diluições 1:20, 1:40 e 1:80 e 90,9% (40/44) na diluição 1:160 (Tabela 1). Já para o teste RIFI-BM, os resultados não-reagentes foram: 36,3% (16/44) na diluição 1:20, 50,0% (22/44) na diluição 1:40, 56,8% (25/44) na diluição 1:80 e 52,2% (23/41) na diluição 1:160 (Tabela 2). Observou-se também que não houve correlação específica entre os diferentes estágios da doença e os diferentes graus de fluorescência da leitura da reação, pois todas as formas clínicas distribuíram-se em todas as faixas de leitura, variando de < 25% (fracamente positiva) a 3+ (75%).

A diluição 1:20 do teste RIFI-CH (Tabela 1) apresentou o melhor coeficiente de contingência (0,755) e a maior força de associação entre as duas variáveis estudadas (qui-quadrado = 124,3), sendo considerada a diluição-referência do teste e utilizada para o estudo comparativo com as diferentes diluições do teste de RIFI-BM. Para este teste os melhores resultados foram obtidos na diluição 1:40, que apresentou o melhor coeficiente de contingência (0,680) e a maior força de associação (qui-quadrado=80,8) (Tabela 2).

Na análise gráfica TG-ROC da Figura 1 observam-se os valores dos parâmetros de sensibilidade e especificidade, representados no eixo y, enquanto que no eixo x estão os valores das leituras realizadas em cruces, as quais foram transformadas em percentagens (valores dos pontos de corte). A análise gráfica TG-ROC compara as leituras da diluição 1:20 do antígeno homólogo (RIFI-CH), consideradas como teste-referência, com as leituras de cada uma das diluições (1:20, 1:40, 1:80 e 1:160) da RIFI-BM (antígeno heterólogo) (Figura 1).

A Figura 1 foi construída aplicando-se o valor do novo ponto de corte da diluição 1:40 (Figura 1B) estabelecido pela análise TG-ROC do grupo A na população canina do grupo B. As 160 amostras pareadas de soro e de sangue colhidas em papel filtro já haviam sido avaliadas na diluição 1:40, uma vez que esta diluição é a recomendada pela bula do kit RIFI-BM. Todavia, nessa mesma diluição, não foram considerados positivos os

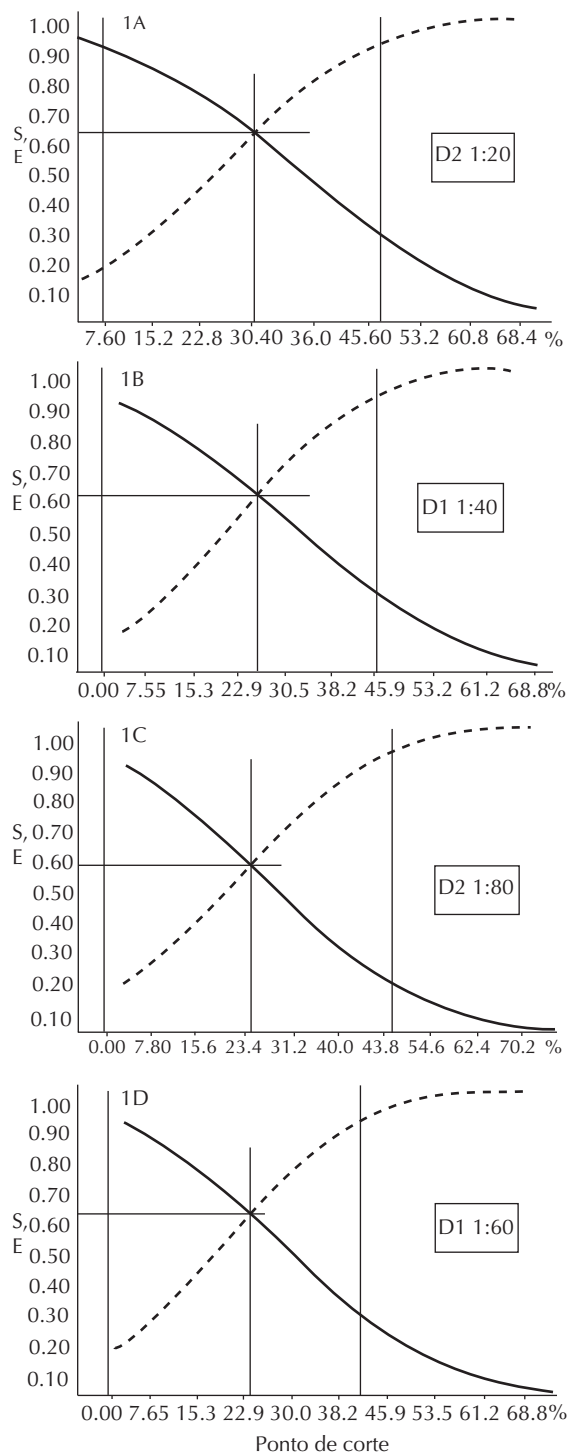


Figura 1. Curvas Especificidade (—) e Sensibilidade (----) realizadas com as leituras da diluição 1:20 do antígeno homólogo (RIFI-CH) versus as diluições do antígeno heterólogo (RIFI-BM): 1A) diluição 1:20, ponto de corte = 30,67% e S=E= 61,71% ; 1B) diluição 1:40, ponto de corte= 26,70 % e S=E= 57,50%; 1C) diluição 1:80, ponto de corte = 24,17% e S=E=52,71% e 1D) diluição 1:160, ponto de corte = 24,14% e S=E= 57,43%.

Tabela 1. Distribuição das freqüências observadas na leitura da RIFI semi-quantitativa (diluções 1:20 a 1:160) realizada com antígeno específico de *L. chagasi*, nas amostras de soro de cães do grupo A, segundo percentagem de fluorescência e diagnóstico clínico. Andradina, Araçatuba e São Paulo, SP, 2003.

Diagnóstico clínico	% de fluorescência																							
	Diluição 1:20						Diluição 1:40						Diluição 1:80						Diluição 1:160					
	0	<25	25	37	50	62	75	total	0	<25	25	37	50	62	75	total	0	<25	25	37	50	62	75	total
Sadio	42	1	0	0	1	0	0	44	42	1	0	0	0	0	0	44	40	2	2	0	0	0	0	44
%	44,7	1,1	-	-	1,1	-	-	46,9	44,7	1,1	-	1,1	-	-	-	46,9	45,6	1,1	1,1	-	-	-	-	46,7
Sintomático	0	3	9	3	12	2	1	30	0	5	9	3	12	0	1	30	2	8	7	5	5	0	2	29
%	-	3,2	9,6	3,2	12,8	2,1	1,1	33,0	-	5,3	9,6	3,2	12,8	-	1,1	32,0	2,1	8,6	7,5	5,4	5,4	-	2,1	31,1
Oligossintomático	0	3	4	2	8	1	0	18	1	4	2	4	6	1	0	18	2	6	4	2	3	1	0	18
%	-	3,2	4,2	2,1	8,5	1,1	-	19,1	1,1	4,2	2,1	4,2	6,4	1,1	-	19,1	2,1	6,4	4,3	2,1	3,2	1,1	-	19,2
Assintomático	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	2	0	0	2	0
%	-	-	-	-	-	2,1	-	2,1	-	-	-	-	1,1	1,1	-	2,2	-	-	-	2,1	-	-	1,1	-
Total	42	7	13	5	21	5	1	94	43	10	11	8	19	2	1	94	46	15	12	7	10	1	2	93
%	44,7	7,5	13,8	5,3	22,3	5,3	1,1	100,0	45,8	10,6	11,7	8,5	20,3	2,2	1,1	100,0	49,4	16,1	12,9	7,5	10,7	1,1	2,1	100,0
Qui-quadrado = 124,3						Qui-quadrado = 114,7						Qui-quadrado = 92,4						Qui-quadrado = 72,7						
Coefic contingência = 0,755						Coefic contingência = 0,741						Coefic contingência = 0,706						Coefic contingência = 0,660						
p<0,0001						p<0,0001						p<0,0001						p<0,0001						

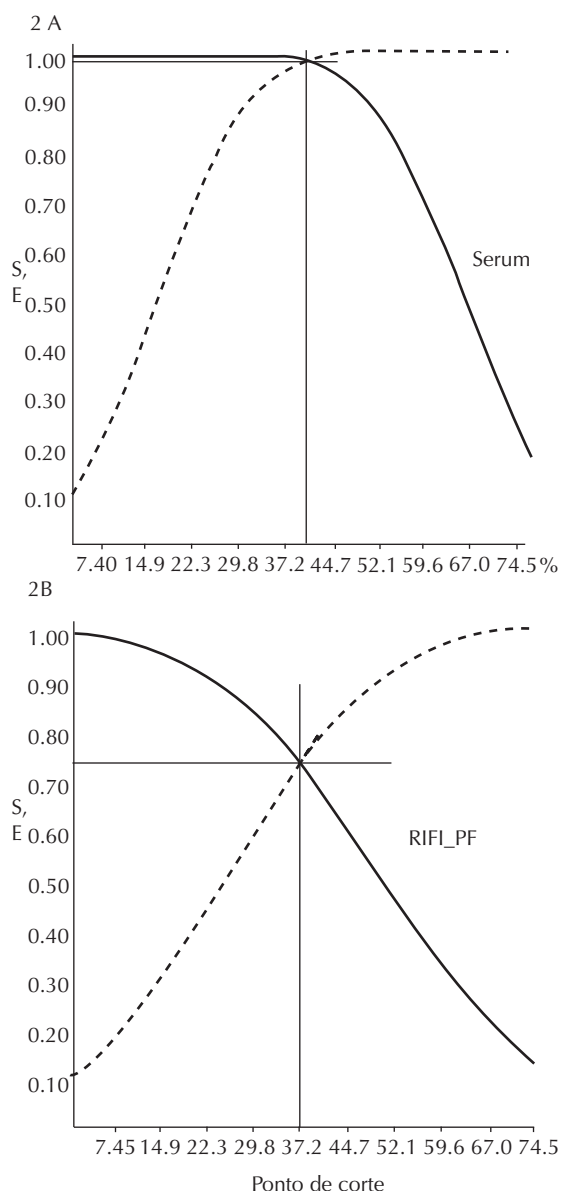


Figura 2. Curvas de Especificidade (—) e Sensibilidade (----). Análise das leituras da RIFI-BM com os cães do grupo B. A análise TG-ROC foi realizada com o novo padrão do ponto de corte encontrado na diluição 1:40 (ponto de corte > 26,70%). 2A - Amostras de soro: ponto de corte = 39,52% e os valores de $S=E=98\%$. 2B - Amostras de sangue colhido em papel filtro: ponto de corte = 37,20% e os valores de $S=E=73\%$.

resultados com reação de fluorescência que apresentasse 1+ ou 25% de fluorescência, pois o ponto de corte considerado foi igual 26,70%, portanto >25%. Na Figura 2A, as estimativas dos parâmetros de sensibilidade e especificidade foram 98% e o novo valor do ponto de corte foi 39,5%. O mesmo procedimento em relação ao ponto de corte foi realizado com os mesmos cães, cujo sangue foi colhido em papel filtro e os valores de

sensibilidade e especificidade foram 73% e novo valor do ponto de corte igual a 37,2% (Figura 2B).

A Tabela 3 mostra as novas estimativas dos parâmetros de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, eficiência e classificação incorreta para a RIFI-BM, tomando-se como base o ponto de corte fornecido na análise TG-ROC e tendo como referência a diluição 1:20 do teste RIFI-CH. Os novos pontos de corte apresentados na Figura 1 resultaram em novos valores para parâmetros de sensibilidade e especificidade.

DISCUSSÃO

A análise gráfica TG-ROC⁷ permite encontrar o valor do ponto de corte associado com a combinação dos parâmetros de sensibilidade e especificidade. Desta forma, a acurácia do teste de diagnóstico permite discriminar indivíduos doentes de não doentes (sadios).

No presente trabalho, aplicou-se a análise gráfica TG-ROC na população do grupo A comparando dois testes diagnósticos, um específico, RIFI-CH, utilizando antígeno homólogo e outro feito com antígeno heterólogo, RIFI-BM. Observamos que a melhor separação entre cães com sorologia negativa (sadios) e com sorologia positiva (possivelmente doentes) foi com a diluição 1:20 do teste RIFI-CH, que apresentou melhor coeficiente de contingência e qui-quadrado (Tabela 1), enquanto que para o teste RIFI-BM foi a diluição 1:40 que melhor separou as duas sub-populações (Tabela 2).

Desta forma, o novo ponto de corte sugerido nas diluições 1:20 e 1:40 da RIFI-BM (Figura 1), acima de 25% (1+), exclui os resultados 1+ como positivo, resultando em caráter negativo. Neste caso, com a população do grupo A, quando se analisam os resultados dos referidos testes comparativamente, sem o ajuste do ponto de corte, observa-se significativa diferença entre eles. Isto pode ser explicado pelas características dos casos próximos ao ponto de corte, que geralmente possuem baixos títulos de anticorpos e é a faixa na qual geralmente, a reatividade cruzada é observada. Estudos que avaliaram o teste imunoenzimático (ELISA) empregando diferentes extratos antigênicos e com cães de área endêmica para LVC observaram a existência de reações cruzadas com outras doenças parasitárias (doença de Chagas, dirofilariose e babesiose), tanto com antígeno homólogo de *L. chagasi* como com antígeno heterólogo de *L. amazonensis*, ao passo que quando utilizaram os antígenos recombinantes rk-39 e rk-26, não foi observada nenhuma reatividade cruzada.¹⁵ Outro trabalho⁵ mostrou a ocorrência de reações cruzadas ao comparar três métodos sorológicos para LVC: RIFI, ELISA e *direct agglutination test* (DAT). Após analisadas 234 amostras de cães de uma área endêmica de Minas Gerais, os índices de especificidade para os testes RIFI e ELISA foram baixos, 52%

Tabela 2. Distribuição das frequências observadas na leitura da RIFI semi-quantitativa (diluições de 1:20 a 1:160) realizada com o kit de Biomanguinhos nas amostras de soro de cães do grupo A, segundo percentagem de fluorescência e diagnóstico clínico. Andradina, Araçatuba e São Paulo, SP, 2003.

Diagnóstico clínico	% de fluorescência																															
	Diluição 1:20						Diluição 1:40						Diluição 1:80						Diluição 1:160													
	0	<25	25	37	50	62	75	Total	0	<25	25	37	50	62	75	Total	0	<25	25	37	50	62	75	Total								
Sadio	16	19	6	1	1	0	1	44	22	16	5	0	1	0	0	44	25	10	5	1	2	0	1	44	23	14	2	2	0	0	41	
%	17,0	20,2	6,4	1,1	1,1	-	1,1	46,8	23,4	17,0	5,3	-	1,1	-	-	46,8	26,5	10,1	5,3	1,1	2,1	-	1,1	46,8	25,3	15,4	2,2	2,2	-	-	45,1	
Sintomático	0	1	9	6	9	2	3	30	0	1	10	7	7	1	4	30	1	3	12	4	7	1	2	30	0	5	12	2	7	1	3	30
%	-	1,1	9,6	6,4	9,6	2,1	3,2	32,0	-	1,1	10,6	7,5	7,5	1,1	4,2	32,0	1,6	3,2	12,8	4,2	7,5	1,1	2,1	32,0	-	5,5	13,2	2,2	7,2	1,1	3,3	33,0
Oligossintomático	0	0	4	3	6	2	3	18	0	1	4	4	6	1	2	18	0	4	6	2	5	1	0	18	0	2	6	4	4	1	1	18
%	-	-	4,2	3,2	6,4	2,1	3,2	19,1	-	1,1	4,2	4,2	6,4	1,1	2,1	19,1	-	4,2	6,4	2,1	5,3	1,1	-	19,1	-	2,2	6,6	4,4	4,4	1,1	1,1	19,8
Assintomático	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	1	1	0	0	2	
%	-	-	-	-	1,1	-	1,1	2,2	-	-	-	2,1	-	-	-	2,1	-	-	-	2,1	-	-	-	2,1	-	-	1,1	1,1	-	-	2,2	
Total	16	20	19	10	17	4	8	94	22	18	19	13	14	2	6	94	26	17	23	9	14	2	3	94	23	21	22	9	11	2	4	91
%	17,1	21,3	20,2	10,6	18,1	4,2	8,5	100,0	23,4	19,1	20,2	13,8	14,9	2,1	6,4	100,0	27,6	18,1	24,5	9,5	13,9	2,2	3,2	100,0	25,3	23,1	24,1	9,9	12,7	2,2	4,4	100,0
Qui-quadrado = 71,9						Qui-quadrado = 80,8						Qui-quadrado = 65,7						Qui-quadrado = 66,8														
Coefic contingência = 0,654						Coefic contingência = 0,680						Coefic contingência = 0,641						Coefic contingência = 0,651														

Tabela 3. Resultados do teste RIFI-BM para diluições com pontos de cortes da análise TG-ROC versus a diluição 1:20 do teste RIFI-CH (amostras do grupo A). Andradina, Araçatuba e São Paulo, SP, 2003.

RIFI-BM Pontos de corte (x0)	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo +	Valor preditivo –	Índice de Youden	Classificação incorreta
Diluição 1:20 x0= 30,67%	68,00 (55,37;80,03)	93,22 (85,73;100,00)	91,67 (83,09;100,00)	71,93 (60,26;83,59)	0,64 (0,46;0,86)	0,20
Diluição 1:40 x0=26,70%	68,30 (55,37;80,03)	97,72 (93,32;100,00)	96,97 (91,12;100,00)	70,49 (59,04;81,93)	0,62 (0,47;0,76)	0,18
Diluição 1:80 x0= 24,17%	80,20 (68,91;91,08)	79,54 (67,62;91,46)	53,19 (43,10;63,27)	77,77 (65,63;89,92)	0,60 (0,44;0,76)	0,17
Diluição 1:160 x0=24,14%	88,46 (79,77;97,14)	47,61 (32,51;62,72)	72,64 (56,52;78,76)	76,92 (60,72;93,11)	0,36 (0,18;0,53)	0,11

e 64% respectivamente, apresentando reações cruzadas com soros de cães infectados com *T. cruzi*, *L. braziliensis* e *E. canis*, ao passo que a especificidade do DAT foi alta, de 95%, apresentando somente um animal com *E. canis*, com sorologia positiva para LVC, da mesma forma, em outros estudos realizados em Córsega, no Mediterrâneo, os autores observaram para o DAT, 100% de especificidade.^{5,13} Por outro lado, em outros estudos utilizando amostras de soro de três cães infectados por *Babesia sp.* e de um cão com erliquiose, não se observou reatividade cruzada quando submeteram estas amostras a RIFI para LVC.¹⁶

A melhor estimativa para o valor do parâmetro especificidade foi encontrada na diluição 1:40 (E= 97,7%), embora a diluição 1:80 apresente a melhor estimativa para o parâmetro sensibilidade (S= 80,2%) (Tabela 3). Estes resultados mostram a possibilidade de escolha das diluições de corte e das tomadas de decisão mais adequadas para o ponto de corte. Por exemplo, a diluição 1:40 com ponto de corte maior que 26,7% apresenta as melhores estimativas de especificidade e valor preditivo positivo, permitindo que os cães verdadeiros negativos não sejam sacrificados. Por outro lado, quando se escolhe a diluição 1:80, com melhor índice de sensibilidade (80,2%) e especificidade mais baixa (79,5%), o valor preditivo positivo também diminui (53,2%), promovendo a possibilidade de cães sadios serem sacrificados. De qualquer forma a decisão a ser tomada implica conhecimento dos custos e benefícios que o ponto de corte escolhido possa oferecer.

A Tabela 3 apresenta valores para classificação incorreta em torno de 20%, 18% e 17%, nas diluições 1:20, 1:40 e 1:80, respectivamente, mostrando que este parâmetro também deve ser avaliado juntamente com a sensibilidade e especificidade. A comparação dos resultados obtidos em cada uma das diluições da RIFI-BM com a diluição 1:20 da RIFI-CH (teste- referência) indica que muitos soros não apresentaram concordância, provavelmente devido a diferenças antigênicas dos dois antígenos e pela diminuição de avidéz do anticorpo, ou uma questão de zona de equivalência da reação

antígeno-anticorpo entre os soros analisados. Assim, observou-se uma diminuição da sensibilidade nas diluições 1:20 e 1:40 em relação à diluição 1:80 e 1:160, que apresenta o parâmetro classificação incorreta igual a 11%. A escolha da diluição 1:40 com ponto de corte superior a 25% seria melhor, pois, embora a estimativa de sensibilidade seja 68,3%, o intervalo de confiança está dentro do intervalo de confiança da diluição 1:80 que apresenta sensibilidade 80,2% e na diluição 1:40, a estimativa do parâmetro especificidade é o que apresenta maior valor 98,0% e classificação incorreta varia muito pouco entre as duas diluições (0,18 e 0,17).

Na literatura, alguns autores consideram que a melhor diluição de corte para o teste RIFI é 1:80.^{12,14,15} No caso do teste RIFI-BM utilizado em programas de vigilância e controle da leishmaniose visceral, a diluição 1:40 é geralmente preconizada como diluição de corte, mas considerando a leitura de 1+ como positiva. Assim, o valor estimado para sensibilidade e especificidade igual a 57,5% resulta uma diferença de quase 40% na especificidade e, após a reclassificação, a especificidade foi 97,5%.

Estudos têm observado altos níveis de sensibilidade e especificidade nos testes sorológicos utilizados em inquéritos caninos. Estudos de revisão¹ sobre diagnóstico de LVC com teste RIFI apresentam valores de sensibilidade variando de 90 a 100% e especificidade de 80% para amostras de soro. Outros autores¹² apontaram para a RIF valores de sensibilidade e especificidade de 98,4% e 100%, respectivamente. Outros estudos¹¹ compararam resultados sorológicos de amostras de 86 cães com exame parasitológico positivo, em cinco laboratórios que realizam diagnóstico sorológico de LVC, por meio dos testes RIFI e ELISA. Para o teste de RIFI a sensibilidade variou de 98,8% a 100% e a especificidade de 94,7% a 100% e para o ELISA estes valores foram 98,8% a 100% de sensibilidade e 96,5% a 100% de especificidade. Considerando a semelhança entre os resultados desses estudos, parece haver um viés na amostragem, uma vez que a comparação do teste sempre é feita utilizando painéis

de soros conhecidos, ou seja, não utilizam amostras populacionais de regiões endêmicas e não endêmicas, prejudicando a verdadeira avaliação do teste, ocasionando uma super estimativa dos parâmetros.

Todavia, os valores reais dos parâmetros de sensibilidade e especificidade observados na Figura 1 e Tabela 3 são mais próximos dos valores esperados para populações de cães que apresentam o status da doença distribuídos homogeneamente, ou seja, doentes (sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos) e sadios, como observado na população de grupo A. Por outro lado, a população do grupo B foi constituída por uma maioria de cães verdadeiros positivos, apresentando viés de amostragem e, conseqüentemente, distorcendo os valores de sensibilidade e especificidade. Tal fato ocorre rotineiramente nos estudos realizados com os testes em que se utilizam amostras não aleatórias para avaliação dos kits de diagnósticos.

Outra questão relevante no uso do teste RIFI-BM nos inquéritos sorológicos é a sua utilização em amostras colhidas em papel filtro. Esta avaliação foi feita com soros do grupo B (Figura 2). Este grupo era constituído de amostras pareadas de soro e papel filtro, porém a maioria dos casos apresentava resultados fortemente positivos, ou seja, leituras da RIFI acima de 2+ (50%). Desta forma, a análise TG-ROC apresentou valores muito altos para as estimativas de sensibilidade e

especificidade igual a 98% para as amostras dos soros, enquanto que para as amostras de sangue em papel filtro os referidos valores foram 73%, mostrando diferença de 25% na utilização de soro em relação ao papel filtro. Há vários estudos comparando resultados da RIFI realizada em amostras pareadas de soro e eluatos. Alguns trabalhos^{2,4} referem baixos valores para o parâmetro sensibilidade da RIFI com eluato, quando comparada com método de ELISA com soro. Por outro lado, outros autores encontraram elevada concordância nos resultados deste teste em amostras de soro e eluato.¹⁵

Tais considerações são importantes na avaliação de testes de diagnóstico, principalmente no que diz respeito à amostragem utilizada na comparação. Para evitar tal viés, estudos de validação de testes diagnósticos⁹ sugerem um roteiro com todas as variáveis que devem ser controladas para avaliação de testes de diagnósticos.

Em conclusão, o presente artigo mostra como a análise TG-ROC pode fornecer importantes informações sobre os testes de diagnósticos, como também apresenta sugestões sobre pontos de cortes que podem melhorar as estimativas dos parâmetros sensibilidade e especificidade do teste, e avaliá-los a luz do melhor custo e benefício. Além disso, oferece maior consistência para a tomada de decisões nas análises de resultados de inquéritos soro-epidemiológicos.

REFERÊNCIAS

1. Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad Saude Publica*. 2004;20(1):259-65. DOI:10.1590/S0102-311X2004000100043
2. Ashford D, Badaro R, Eulalio C, Freire M, Miranda C, Zalis MG, et al. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the falcon assay screening test- enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Am Soc Trop Med Hyg*. 2003;48(1):1-8.
3. Braga MDM, Coelho ICB, Pompeu MMLP, Evans TG, MacAuliffe IT, Teixeira MJ, et al. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998;31(4):419-24. DOI:10.1590/S0037-86821998000500001
4. Evans TG, Vasconcelos IA, Lima JW, Teixeira JM, Mc Auliffe IT, Lopes UG, et al. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnosis methods. *Am J Trop Med Hyg*. 1990;42(2):118-23.
5. Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol*. 2007;146(3-4):235-41.
6. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7(3):338-49. DOI:10.1590/S1415-90X2004000300011
7. Greiner M. Two-graph receiver operating characteristics (TG-ROC): a Microsoft-EXCEL template for the selection of cut off values in diagnostic tests. *J Immunol Methods*. 1995;185(1):145-6.
8. Greiner M. Two-graph receiver operating characteristics (TG-ROC): update version supports optimisation of cut-off values that minimise overall misclassification costs. *J Immunol Methods*. 1996;191(1):93-4.
9. Greiner M, Gardner IA. Epidemiologic issues in the validation of diagnostic tests. *Prev Vet Med*. 2000;45(1-2):3-22.
10. Iversson LB, Camargo ME, Rocha e Silva EO, Chieffi PP, Barros JAC. Investigação epidemiológica de um caso de leishmaniose visceral autóctone da Grande São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica*. 1979;13:159-67. DOI:10.1590/S0034-89101979000200012
11. Machado JG, Moraes JRC, Costa RT, Nascimento E, Moreira EC. Comparação dos resultados dos métodos de imunofluorescência indireta e ELISA indireto no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina realizado pelos laboratórios de Belo Horizonte, MG, Brasil. *Vet Zootec*. 2007;14(1):47-51.
12. Mancianti F, Falcone ML, Gianelli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 1995;59(1):13-21.
13. Neogy AB, Vouldoukis I, Silva AO, Tselentis Y, Lascombe JC, Segalen T, et al. Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *Am J Trop Med Hyg*. 1992;47(6):772-7.
14. Nogueira YL. Estimativa de validade de um novo método de isolamento de vírus rábico. *Rev Saude Publica*. 2004;38(2):315-22. DOI:10.1590/S0034-89102004000200023
15. Rosário EY, Genaro O, França-Silva JC, Costa RT, Mayrink W, Reis AB, et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine for visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(2):197-203. DOI:10.1590/S0074-02762005000200015
16. Vercammen F, Berkvens D, Le Ray D, Jacquet D, Vervoort T. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. *Vet Rec*. 1997;141(13):328-30.